



TITLE:

ヒト膀胱平滑筋細胞の形態学的 Phenotypeの検討

AUTHOR(S):

松本, 成史; 花井, 禎; 栗田, 孝; 秋山, 隆弘

CITATION:

松本, 成史 ...[et al]. ヒト膀胱平滑筋細胞の形態学的Phenotypeの検討.
泌尿器科紀要 2003, 49(12): 715-719

ISSUE DATE:

2003-12

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/115101>

RIGHT:

ヒト膀胱平滑筋細胞の形態学的 Phenotype の検討

近畿大学医学部泌尿器科 (主任 : 栗田 孝教授)

松本 成史, 花井 禎, 栗田 孝

近畿大学医学部堺病院泌尿器科 (院長 : 秋山隆弘)

秋 山 隆 弘

PHENOTYPIC CHANGES IN HUMAN BLADDER
SMOOTH MUSCLE CELL

Seiji MATSUMOTO, Tadashi HANAI and Takashi KURITA

From the Department of Urology, Kinki University School of Medicine

Takahiro AKIYAMA

From the Department of Urology, Sakai Hospital, Kinki University School of Medicine

Tissue specimens were resected from 15 patients (age 7 to 82, average 52.2 years old) with bladder diseases ; i.e., 2 with neurogenic bladder, 6 recipients of kidney transplantation with defunctionalized bladder, 3 with benign prostatic hypertrophy, 3 with bladder cancer and 1 with vesicoureteral reflux. We investigated the phenotypic expression of the bladder smooth muscle cells with bladder diseases. The ratio of non-contractile to contractile phenotypes (nc/c ratio) showed a rising tendency with aging. The increase of nc/c ratio was especially notable with neurogenic bladder.

Phenotypic expression was observed in human bladder smooth muscle cells as reported in vascular smooth muscle cells. Several bladder diseases cause a conversion of contractile smooth muscle cell phenotype from contractile type to non-contractile type, and this modulation of smooth muscle cell phenotype may play an important role in detrusor function.

(Acta Urol. Jpn. 49 : 715-719, 2003)

Key words : Human, Bladder smooth muscle cell, Phenotype, Detrusor function

緒 言

近年、冠動脈をはじめとする血管平滑筋細胞は形態学的に収縮型, 合成型 phenotype に分類され, とくに, 動脈硬化においては phenotype の形質変換がその原因の重要な一要素を担っている^{1,2)} 収縮型平滑筋細胞の細胞質は筋原線維に富み, 細胞内小器官に乏しく, その基本的機能は収縮にある. 一方, 合成型平滑筋細胞は筋原線維が乏しく, 細胞内小器官が発達し, 種々のサイトカインや細胞外マトリクスを産生分泌し, 血管の動脈硬化や狭窄などの病変形成に重要な役割を果たしているものと考えられている. しかし, 膀胱平滑筋細胞についてはこの phenotype の概念における形質変換に対するメカニズムは未だ不明である.

われわれは, これまでにラット尿道狭窄モデルを用いて膀胱平滑筋細胞にもこの形態学的 phenotype が存在し, 長期経過において phenotype が形質変換していることを報告してきた³⁾ 今回, ヒト膀胱平滑筋細胞における phenotype について検討し, 同時に筋層内の線維化についての関連も検討したので報告す

る.

対 象 と 方 法

1999~2000年までの2年間に近畿大学医学部泌尿器科および近畿大学医学部堺病院泌尿器科で膀胱疾患に対して手術加療され, 膀胱の一部分, または全摘出した症例のうち, 膀胱体部の標本を一部本研究に提供することに同意をえた15症例 (年齢7~82歳, 平均52.1歳, 男性11例, 女性4例) を対象にした. 基礎疾患の内訳は, 神経因性膀胱 (NgB) ; 2例, 慢性腎不全 (レシピエント, defunctionalized bladder) (CRF) ; 6例, 前立腺肥大症 (BPH) ; 3例, 膀胱癌 (BT) ; 3例, 膀胱尿道逆流症 (VUR) ; 1例であった (Table 1). NgB 症例は併発病変に対する膀胱手術時 (症例1は膀胱全摘出時, 症例2は膀胱切石術) に, CRF 症例は腎移植術時の尿管膀胱新吻合術時, VUR 症例は尿管膀胱新吻合術時に, 膀胱壁を一部切除した. BPH 症例は TUR-P 施行時に膀胱生検術を施行した. BT 症例においては膀胱全摘出標本から癌病変の認めない一部分を使用した.

全例, まず hematoxylin-eosin (HE) 染色にて病理

Table 1. Patients profile include with nc/c ratio and % fibrosis of human bladder smooth muscle cell

Pt.	Age (yrs)	Sex	Disease	Others	nC/C	% fibrosis
1	82	M	NgB	19 g, detrusor weakness, urinary retention	1.786	—
2	68	F	〃	CIC	4.500	24.57
3	61	F	CRF	HD; 17 yrs	0.856	16.74
4	35	F	〃	HD; 11 mo	1.084	16.36
5	45	M	〃	HD; 10 mo	0.617	18.40
6	32	M	〃	HD; 11 mo	1.073	16.42
7	18	M	〃	CAPD; 2 yrs	0.234	25.08
8	17	F	〃	HD; 22 mo	0.521	27.53
9	78	M	BPH	15 g, Qmax; 5.6 ml/s, BOO; 5	0.235	—
10	80	M	〃	18 g, Qmax; 5.1 ml/s, BOO; 4	0.644	—
11	78	M	〃	30 g, Qmax; 3.5 ml/s, BOO; 4	0.367	—
12	76	M	BT	—	0.379	31.18
13	48	M	〃	—	0.405	30.85
14	58	M	〃	—	0.583	15.42
15	7	M	VUR	—	0.104	18.68

CIC; clean intermittent catheterization, HD; hemodialysis, PD; peritoneal dialysis, Qmax; max flow rate, BOO; bladder outlet obstruction under pressure flow study.

Table 2. Morphological criteria to discriminate between contractile and synthetic phenotype (in vascular smooth muscle cells)

	Phenotype	
	Contractile type	Synthetic type
Size and shape	Spindle	Round or/and oval
Background	Collagen, elastin	Glycosaminoglycan
Myofilament	↑↑	↓
Rough ER	↓(+)	↑↑(+)
Golgi apparatus	↓(+)	↑↑(+)
Free ribosome	↓(+)	↑↑(+)
Mitosis	↓(+)	↑(-)
Lysosome	(+)	(#)
Dense body	(+)	(#)

組織学的に、提供標本が膀胱平滑筋層部であること、特に BT 症例では癌病変を認めないことを確認した。ついで提供標本を用いて、以下の項目について検討した。

1) 透過型電子顕微鏡による膀胱平滑筋細胞の phenotype の検討：日立 H-7100・H-800 を用い 1 標本につき 4 写真 (×8,000) を撮影した。Table 2 の収縮型 (contractile type), 合成型 (synthetic type) phenotype の特徴に基づき、1 写真内の平滑筋細胞を収縮型と非収縮型に区別しその個数の比 (nc/c 比) を求めた。Phenotype の判定基準は血管平滑筋細胞の分類に基づき²⁾、①収縮型 (contractile type): myofilament に富み、dense body, 基底膜が求められ、その他の細胞内小器官はほとんど認められない細胞、②中間型 (intermediate type): myofilament が細胞内の一部に認められるが、細胞内小器官が核周囲

に多く見られる細胞、③合成型 (synthetic type): 粗面小胞体やゴルジ装置などの細胞内器官が豊富であるが、myofilament はなく、基底膜も見られない細胞の 3 種類とし、今回は収縮型 (contractile type) と非収縮型 (合成型と中間型) (non-contractile type) の 2 種類に分類した。

2) % fibrosis: Mallory-Azan 染色標本を 1 標本につき 6 写真 (×200) を MacScope にて撮影し、筋層内の線維成分の占める面積比を LUZEX-FS IMAGE ANALYZER を用いて計算した。

結 果

1) nc/c 比 (Table 1, Fig. 1)

透過型電子顕微鏡による膀胱平滑筋細胞の観察では、収縮型から非収縮型への移行において膀胱平滑筋細胞は細胞内小器官の発達により膨化し、1 視野あたりの細胞数としては減少していた。また、非収縮型の細胞が増加している病態では、個々の膀胱平滑筋細胞すべてが収縮型の特長が減じており、一部が変化するのではなく、全般的に膀胱平滑筋細胞が変化していくことが観察できた。

疾患別の nc/c 比では、神経因性膀胱症例では、他疾患に比して nc/c 比は高く、非収縮型が増加していた。CRF 症例においては、一部の症例で nc/c 比は高く、非収縮型が増加していた。BPH 症例においては全例 pressure flow study にて bladder outlet obstruction (BOO) を認めたが、nc/c 比は低く、収縮型が優位な症例であった。

加齢における nc/c 比の変化には相関関係は認めなかったが、CRF 症例においては、nc/c 比は加齢によ

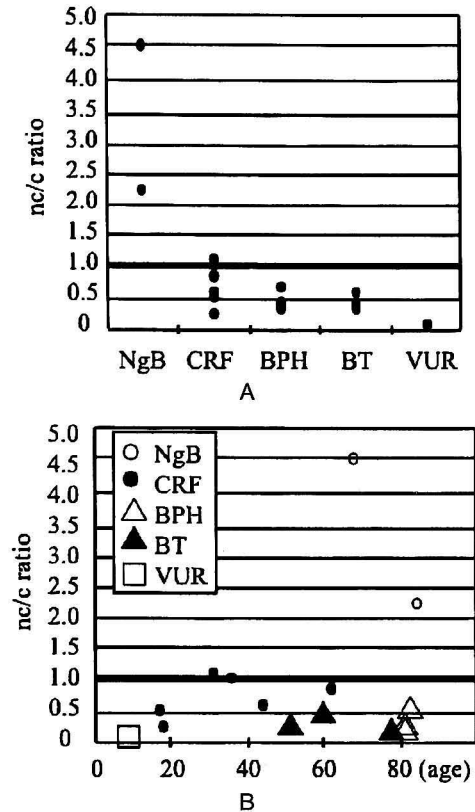


Fig. 1. A: nc/c ratio of each disease. B: nc/c ratio of ageing.

る増加傾向を示した。

2) % fibrosis (Table 1)

膀胱平滑筋層内の線維化率 (% fibrosis) は, Table 1 に示すように15~30%台までであったが, 疾患別で傾向を認めず, また nc/c 比とも相関を認めなかった。

代表症例を提示する。

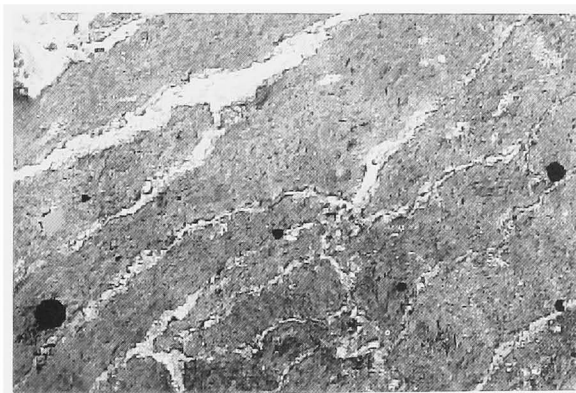
〈症例9〉収縮型 phenotype 症例 (Fig. 2)

78歳, 男性. 排尿障害を主訴に来院. 精査にて前立腺肥大症と診断した. Pressure-flow study にて BOO; 5, Pdet Qmax; 141 mmHg, UIC は認めなかった. 患者の希望もあり, 1999年8月12日に TUR-P 施行された. 切除重量は 15 g であった. 術前に膀胱生検を施行し, 標本として提供を受けた。

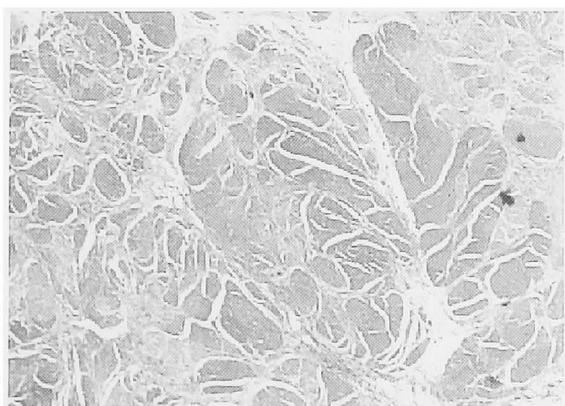
透過型電子顕微鏡による本症例の膀胱平滑筋細胞の phenotype の検討では myofilament に富み, 細胞内小器官がほとんど認められず. nc/c 比は0.235と収縮型が優位で収縮型 phenotype と診断した. Mallory-Azan 染色による % fibrosis の測定では15.83%であった。

〈症例2〉合成型 phenotype 症例 (Fig. 3)

68歳, 女性. 糖尿病による神経因性膀胱にて5年来

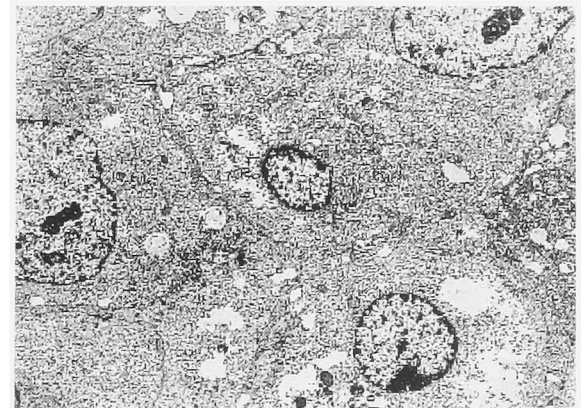


A

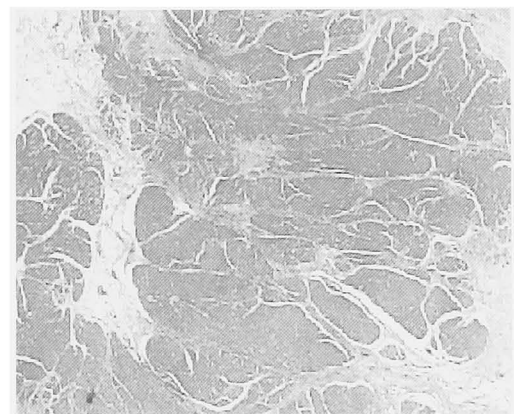


B

Fig. 2. Case 9 (contractile phenotype). A: Electron microscopy ($\times 8,000$). B: Mallory-Azan stain ($\times 200$).



A



B

Fig. 3. Case 2 (synthetic phenotype). A: Electron microscopy ($\times 8,000$). B: Mallory-Azan stain ($\times 200$).

の清潔自己導尿施行中の患者で、自排尿はなく1日5～6回の清潔自己導尿にて管理していた。当科には血尿精査・加療目的で紹介された。精査にて、左腎盂腫瘍および多発膀胱腫瘍と診断され、2000年12月4日左腎盂尿管・膀胱全摘出術を施行された。癌病変のない部分を一部、標本として提供を受けた。

透過型電子顕微鏡による本症例の膀胱平滑筋細胞の phenotype の検討では細胞内器官が豊富であるが、myofilament は認められなかった。nc/c 比は4.500と非収縮型が優位で合成型 phenotype と診断した。Mallory-Azan 染色による % fibrosis の測定では24.57%であった。

考 察

血管などの正常時および病的時における平滑筋細胞の形態、機能や分子・細胞生物学的性質は非常に多様な性質を示すことが以前より報告されている^{1,2)} 平滑筋細胞は病的状態に対応し、「収縮型」から「合成型」細胞に形質変換をする。またそれぞれの形質は特徴的な構造タンパク、収縮タンパクや受容体タンパク質などを発現している。これら形質変換に関与する研究は、血管培養平滑筋細胞を中心に行われている⁴⁾ しかし、膀胱平滑筋細胞の形質変換に関しては報告がない。

われわれは、ラット尿道狭窄モデルを用い膀胱平滑筋細胞の形態学的変化を phenotype という概念を基に検討し報告してきた³⁾ 尿道狭窄という病的状態において狭窄後6週以降非収縮型 phenotype の割合が増加しており、10週以降の長期経過にかけて非収縮型の割合が著明に増加しており、膀胱平滑筋細胞の形質変換を認めた。血管平滑筋では、動脈硬化をはじめ病的状態において非収縮型（主に合成型）phenotype が増加しており^{1,2)}、今回の結果では特に NgB 症例の膀胱機能が低下した病的状態において非収縮型 phenotype の割合が増加していた。

Elbadawi らは電子顕微鏡を用いてヒトの膀胱壁の変化を検討しており、膀胱平滑筋間の結合や膀胱平滑筋細胞周囲の変化を中心に膀胱の形態学的変化を述べており、phenotype の概念と近似しているが、phenotype や形質変換には言及していない⁵⁾ Baskin らはヒト培養膀胱平滑筋細胞の形態を検討しており、胎児と成人では形態に差異があることを報告しており⁶⁾、この変化は今回用いた phenotype の概念に基づいて分類できるかもしれない。筋層の線維化に関しては、尿道狭窄モデルを用いた基礎研究において、狭窄後早期には % fibrosis は減少するがその後徐々に増加するという報告や経時的な変化は認めず一定であるという報告など統一された見解はない。病理組織学的に狭窄後比較的長期には膀胱の線維化は平滑筋細胞間

隙にまで認められているが、今回のヒト膀胱平滑筋の結果では筋層線維化には明らかな傾向は認められず、phenotype の nc/c 比との相関も認めなかった。これは血管の合成型平滑筋細胞は、種々のサイトカインや細胞外マトリクスを産生・分泌し、線維化などの病変形成に重要な役割を果たしているという報告に反するものであった。

今回の結果では、BPH 症例は全例 BOO が存在するにもかかわらず、有意に非収縮型が増加していなかった。今回の BPH 症例は TUR-P 術後、全例排尿状態が改善していた。このように非収縮型 phenotype が増加していない症例は、非代償期に至っておらず、狭窄を解除することで膀胱機能が戻るということを示唆していると考えられる。また、今回 CRF 症例は、defunctionalized bladder として用い、正常の排尿サイクルを持たない膀胱とした。しかし、実際には透析期間や尿量もばらつきがあり、結果も収縮型 phenotype 優位と考えられる症例から非収縮型 phenotype が増加している症例まで存在し、nc/c 比と透析期間や尿量との一定の関係は認められなかった。腎移植後の長期観察で膀胱機能が多くの症例で改善することから前述のように BPH 症例と同様のことが言えるかもしれない。また BT 症例と VUR 症例は pressure flow study は施行していないが、排尿状態は正常であり、術中所見では膀胱に器質的变化はなく、正常膀胱 (control) と考えた。これらは収縮型の比率が高く、加齢による変化のみと考えられた。

われわれは血管平滑筋細胞の変化と同様に、膀胱平滑筋細胞が phenotype という概念で形質変換していくことが膀胱筋層の変化であり、膀胱機能に影響していると考えている。今回の結果から、ヒト膀胱平滑筋細胞においても収縮型、合成型 phenotype が存在していることが明らかとなった。特に NgB などの病的膀胱では非収縮型が増加していた。今回の検討は、症例数は少ないが、加齢による影響を差し引いても、形質変換は膀胱の器質的变化の度合いに強く影響していると考えられる。膀胱平滑筋細胞において phenotype という概念を用いることで、膀胱の線維化や収縮能の低下、また下部尿路閉塞解除後の変化のメカニズムを解明する一要素として期待できるものと考えられる。

結 語

ヒト膀胱平滑筋細胞の形態学的 phenotype について検討した。

1) ヒト膀胱平滑筋細胞においても血管平滑筋細胞と同様に phenotype という概念を用いて分類することが可能であった。

2) 膀胱において筋層内の線維化と phenotype の

比率に関連を認めなかった。これらの関連に関してはさらなる検討が必要である。

3) NgB などの病的膀胱には合成型 phenotype が優位で, 収縮型から非収縮型へ膀胱平滑筋細胞の phenotype が形質変換しており, この phenotype の調節が排尿筋機能に重要な役割を果たしていると思われる。線維化や収縮能のマーカーとなりうる可能性が示唆された。

本研究は文部科学省の科学研究費 (基盤研究 C, 13671681) の助成を受けた。本論文の要旨は, 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年 5 月, 神戸) にて発表した。本研究にご助言, ご協力して頂いた近畿大学医学部の共同研究施設電子顕微鏡共同研究室内の堀内喜高氏, 奥本勝美氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Mosse PR, Campbell GR, Wang ZL, et al. : Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media. *Lab Invest* **53**: 556-562, 1985
- 2) Halayko AJ, Solway J, Halayko AJ, et al. : Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* **90**: 358-368, 2001
- 3) Matsumoto S, Hanai T, Ohnishi N, et al. : Bladder smooth muscle cell phenotypic changes and implication of expression of contractile proteins (especially caldesmon) in rats after partial outlet obstruction. *Int J Urol* **10**: 339-345, 2003
- 4) Absher M, Woodcock-Mitchell J, Mitchell J, et al. : Characterization of vascular smooth muscle cell phenotype in long-term culture. *In Vitro Cell Dev Biol* **25**: 183-192, 1989
- 5) Elbadawi A, Yalla SV and Resnick NM : Structural basis of geriatric voiding dysfunction. IV. bladder outlet obstruction. *J Urol* **150**: 1681-1695, 1993
- 6) Baskin LS, Howard PS, Duckett JW, et al. : Bladder smooth muscle cells in culture : I identification and characterization. *J Urol* **149**: 190-197, 1993

(Received on May 1, 2003)
(Accepted on September 3, 2003)